
**Qualité du sol — Détermination de
l'activité des déshydrogénases dans
les sols —**

**Partie 2:
Méthode au chlorure de
iodotétrazolium (INT)**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Soil quality — Determination of dehydrogenases activity in soils —
Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)*

ISO 23753-2:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3250e526-107e-49a0-91f7-25dfc0ce4a56/iso-23753-2-2019>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23753-2:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3250e526-107e-49a0-91f7-25dfc0ce4a56/iso-23753-2-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	1
5 Restrictions	2
6 Réactifs et produits	2
7 Appareillage	3
8 Mode opératoire	3
8.1 Établissement de la courbe d'étalonnage.....	3
8.2 Échantillonnage.....	3
9 Calculs	4
10 Critères de validité	5
10.1 Courbe d'étalonnage.....	5
10.2 Échantillons.....	5
11 Rapport d'essai	5
Annexe A (informative) Résultats obtenus avec les paramètres modifiés	6
Bibliographie	8

iTech STANDARD PREVIEW
(standard.iTech.ai)

ISO 23753-2:2019
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3250e526-107e-49a0-91f7-25dfc0ce4a56/iso-23753-2-2019>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 23753-2:2005), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- un nouvel [Article 5](#) «Restrictions» a été ajouté;
- à [l'Article 6](#), les réactifs et leur préparation ont été mis à jour avec les nouveaux résultats (par exemple, concentration du tampon Tris de 100 mmol/l à un pH de 7,6, durée d'incubation comprise entre 4 h et 6 h);
- les nouveaux [Tableaux 1](#) et [2](#) ont été ajoutés;
- [l'Article 10](#) «Critères de validité» a été ajouté;
- une nouvelle [Annexe A](#) «Résultats obtenus avec les paramètres modifiés» a été ajoutée;
- les références de [l'Article 2](#) et de la bibliographie ont été mises à jour.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 23753 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

La microflore du sol est responsable de la décomposition et de la transformation des matières organiques, des cycles du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore, de la stabilité des agrégats du sol et sert de source de nourriture pour les organismes microbivores. Les déshydrogénases, en tant qu'enzymes intracellulaires et composants de la chaîne respiratoire des cellules microbiennes, jouent un rôle fondamental dans la production d'énergie par les organismes. Elles permettent l'oxydation des composés organiques par le transfert d'électrons à un accepteur (par exemple, NAD⁺). Les déshydrogénases sont des composants essentiels du système enzymatique des micro-organismes. L'activité des déshydrogénases peut donc être utilisée comme indicateur des réactions biologiques d'oxydoréduction ainsi que pour mesurer la communauté microbienne viable et physiologiquement active dans le sol.

L'activité microbienne oxydative dans le sol est liée à l'activité respiratoire, qui pourrait être évaluée approximativement en déterminant l'activité des déshydrogénases. La respiration basale et induite dans le sol pourrait être affectée par la gestion, les pratiques de gestion et la contamination des sols.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 23753-2:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3250e526-107e-49a0-91f7-25dfc0ce4a56/iso-23753-2-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3250e526-107e-49a0-91f7-25dfc0ce4a56/iso-23753-2-2019>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 23753-2:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3250e526-107e-49a0-91f7-25dfc0ce4a56/iso-23753-2-2019>

Qualité du sol — Détermination de l'activité des déshydrogénases dans les sols —

Partie 2: Méthode au chlorure de iodotétrazolium (INT)

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de l'activité des déshydrogénases dans le sol à l'aide de chlorure de 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-phényltétrazolium (INT).^{[1]-[5]} Comme la réduction de l'INT est moins sensible à la présence d'O₂, cette méthode est plus robuste que la méthode au CTT décrite dans l'ISO 23753-1.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 11465, *Qualité du sol — Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau — Méthode gravimétrique*

ISO 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206: Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire*

3 Termes et définitions

Aucun terme n'est défini dans le présent document.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

4 Principe

La solution d'INT est ajoutée à un échantillon de sol et le mélange est incubé à 25 °C ± 1 °C pendant 4 h à 6 h, en fonction des usages du sol (sol agricole ou forestier, par exemple). L'iodonitrotétrazolium formazan (INTF) formé est extrait à l'acétone et dosé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 485 nm.

NOTE 1 Cette méthode est fondée sur une version modifiée de la méthode décrite dans la Référence [1].

NOTE 2 L'acétone est utilisée comme solvant d'extraction et cette extraction n'est pas totale dans les échantillons.

5 Restrictions

- La conservation pouvant modifier l'activité enzymatique, il convient de ne pas comparer l'activité des déshydrogénases sur des échantillons conservés pendant des durées différentes.
- Pour les couches supérieures (horizons L, F et H) d'humus de forêt [6] ou les sols à forte teneur en matière organique, [7] cette méthode donne des valeurs très faibles et variables.

6 Réactifs et produits

6.1 Sol

Les échantillons de sol doivent être prélevés et préparés comme spécifié dans l'ISO 18400-206. Si les échantillons qui ont été tamisés à l'état frais ne sont pas analysés immédiatement, ils peuvent être conservés pendant une durée maximale de sept jours à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Déterminer la teneur en matière sèche de l'échantillon conformément à l'ISO 11465.

6.2 Acide chlorhydrique (HCl), $c = 1\text{ mol/l}$.

6.3 Solution tampon Tris, $c = 100\text{ mmol/l}$, pH 7,6.

- Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (n° CAS: 77-86-1 – 121,14 g/mol): 12,12 g;
- eau distillée, qsp pour 1 000 ml;
- acide chlorhydrique (n° CAS: 7647-01-0) (1 mol/l).

Dissoudre 12,12 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau distillée et ajuster le pH à 7,6 avec la solution d'acide chlorhydrique (1 mol/l). Compléter à 1 000 ml. La durée de conservation ne doit pas dépasser un mois à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.4 Solution de substrat (INT), $c = 15\text{ mmol/l}$.

- Chlorure de 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-phényltétrazolium (INT): (n° CAS: 146-68-9 – 505,7 g/mol): 380 mg;
- tampon Tris 100 mmol/l, pH 7,6.

Dans un tube conique de 100 ml, dissoudre 0,38 g d'INT dans 50 ml de tampon Tris à 100 mmol/l, de pH 7,6, et homogénéiser le mélange sur un agitateur magnétique. Traiter le mélange avec une sonde à ultrasons pendant 1 min à 2 min pour dissoudre l'INT autant que possible et obtenir une suspension. La durée de conservation ne doit pas dépasser une semaine à l'abri de la lumière, à une température de $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.5 Acétone de qualité analytique.

6.6 Solution mère d'INTF.

- Iodonitrotétrazolium formazan (INTF), $c = 1\text{ }\mu\text{mol/ml}$ (n° CAS: 7781-49-9 – 471,25 g/mol): 47 mg;
- acétone.

Peser 47 mg d'iodonitrotétrazolium formazan dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre dans de l'acétone et compléter à 100 ml.

7 Appareillage

7.1 Spectrophotomètre pour mesures dans le visible.

7.2 pH-mètre.

7.3 Tubes en verre à fond en U appropriés (35 ml à 50 ml), fioles jaugées, pipettes et microcuves en verre.

Par exemple, de 2 cm de diamètre et d'une capacité minimale de 30 ml à 50 ml (prise d'essai de 5 g; voir également la note de [l'Article 8](#)).

7.4 Incubateur, réglable à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

7.5 Centrifugeuse, avec contrôle de la température à $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et une accélération de 2 000g.

7.6 Sonde à ultrasons.

7.7 Agitateur orbital pour tubes.

8 Mode opératoire

8.1 Établissement de la courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage exige plusieurs concentrations d'iodonitrotétrazolium formazan (INTF), au moins en deux exemplaires et de préférence en trois exemplaires; tous les volumes sont indiqués par tube.

La solution mère d'INTF à la concentration de 1 $\mu\text{mol/ml}$ est utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. Répartir les volumes nécessaires dans des tubes pour obtenir les concentrations suivantes: 0 nmol/ml, 10 nmol/ml, 20 nmol/ml, 40 nmol/ml, 60 nmol/ml, 80 nmol/ml, en double exemplaire ([Tableau 1](#)).

Tableau 1 — Préparation de la courbe d'étalonnage de l'iodonitrotétrazolium formazan dans des tubes

[INTF] nmol/ml	0	10	20	40	60	80
INTF (ml)	0	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
Tampon Tris, pH 7,6 (ml)	1	1	1	1	1	1
Acétone (ml)	4	3,95	3,90	3,80	3,70	3,60

L'INT et l'INTF étant sensibles à la lumière, il convient de placer les solutions à l'abri de la lumière tout au long de l'analyse.

8.2 Échantillonnage

Le sol tamisé est homogénéisé et quatre tubes sont préparés avec des pesées comprises entre $2,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ (petit échantillon) et $5,0\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ (grand échantillon). Le [Tableau 2](#) présente une synthèse du protocole.

En bref, la solution de substrat ([6.4](#)) est ajoutée aux trois répliqués d'échantillons pour essai et la solution tampon Tris ([6.3](#)) est ajoutée au tube témoin au lieu de la solution de substrat ([6.4](#)). Homogénéiser les échantillons sur l'agitateur pour tubes, fermer hermétiquement les tubes avec un bouchon en plastique et les mettre à incuber à l'abri de la lumière (à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 4 h à 6 h).

Pour extraire le formazan formé, ajouter l'acétone aux échantillons ([Tableau 2](#)) et les laisser incuber 1 h à l'abri de la lumière, sous agitation orbitale (250 min^{-1}). Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 2 000 g, 20 °C et les surnageants de chaque tube sont transférés dans une microcuve en